

CONSTITUTION: The objective β 1 \rightarrow 3-N-acetylglucosaminyl transferase is originated from swine serum and has the following enzymatic properties. (1) Action, active to transfer the N-acetylglucosamine residue of uridinediphospho-N-acetylglucosamine with the 3b-bond of an oligosaccharide or a sugar chain having lactose residue on non-reducing terminal, (2) substrate specificity, capable of taking uridinediphospho-N-acetylglucosamine as a sugar donor and an oligosaccharide, etc., having lactose residue on non-reducing terminal as a sugar acceptor; (3) the enzyme has optimum pH of about 8.5, stable pH of 5.5-9.5 and optimum working temperature of about 40°C and is inactivated by the treatment at pH7.2 and $\geq 55^{\circ}\text{C}$ for 15min. It can be produced by salting-out swine serum with ammonium sulfate and purifying the obtained concentrated enzyme protein by anion exchange chromatography and gel-filtration chromatography.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-244942

(43)公開日 平成5年(1993)9月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/02		7823-4B		
15/53	Z N A			
// C 1 2 N 1/21		7236-4B		
(C 1 2 N 9/02		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数7(全 19 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-131057

(22)出願日 平成4年(1992)5月22日

(31)優先権主張番号 特願平3-157117

(32)優先日 平3(1991)6月27日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平3-317064

(32)優先日 平3(1991)11月29日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田339番地

(72)発明者 梶山 直樹

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内

(72)発明者 中野 衛一

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 耐熱性ホタルルシフェラーゼ、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA、及び耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造法

(57)【要約】

【構成】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されていることを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼ、当該耐熱性ルシフェラーゼをコードする遺伝子、当該耐熱性ルシフェラーゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター、及び当該ベクターを用いた耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造方法。

【効果】 本発明耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現により得られる耐熱性ホタルルシフェラーゼは、A T P等の微量検定等において極めて有用である。また本発明の耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造方法により、効率よく上記ルシフェラーゼを得ることが可能であり、産業上極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されているアミノ酸配列をコードする耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項2】 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである請求項1記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項3】 疎水性アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、若しくはバリンである請求項1又は請求項2記載のホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項4】 請求項1又は請求項2記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組み換え体DNAを含み、耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有するエッシャーシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物より耐熱性ホタルルシフェラーゼを採取することを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造法。

【請求項6】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されていることを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼ。

【請求項7】 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである請求項6記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、耐熱性ホタルルシフェラーゼ、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及び耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】ルシフェラーゼは、発光素であるルシフェリンの酸化を触媒して、これを発光させる発光酵素である。そして、ルシフェリンの発光の際にATP等の物質を必要とする、ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカボタル等由来のホタルのルシフェラーゼは、当該性質に基づいて、上記ATP等の微量定量に利用されている。

【0003】しかしながら、一般的にルシフェラーゼは、熱に対して不安定なため、試薬として保存する際に失活しやすいという欠点を有する。かかる欠点を克服するための手段の一つとして、試薬に塩等を添加して、ある程度ルシフェラーゼを安定に保存することは可能である。しかし、この場合にも、ルシフェラーゼの塩による反応障害が惹起され勝ちであるという欠点が存在する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、耐熱性を有するホタルルシフェラーゼを開発することを主たる課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題について鋭意検討した結果、野生型ホタルルシフェラーゼにおける特定のアミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基に変換することにより、上記課題を解決し得ることを見出した。すなわち、本願は、以下の発明を提供するものである。

(1) 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されているアミノ酸配列をコードする耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

(2) 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである(1)記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

(3) 疎水性アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、若しくはバリンである(1)又は(2)記載のホタルルシフェラーゼ遺伝子。

(4) (1)又は(2)記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。

(5) (4)記載の組み換え体DNAを含み、耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有するエッシャーシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物より耐熱性ホタルルシフェラーゼを採取することを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造法。

(6) 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されていることを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼ。

(7) 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである(6)記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ。

【0006】以下、本発明について詳細に説明する。本発明における遺伝子の改変による耐熱性ルシフェラーゼが提供される前提として、野生型のホタルの遺伝子及びその組み換え体DNAを調製することが必要である。野生型ホタルの遺伝子等の種類は、提供が企図される耐熱性ルシフェラーゼ遺伝子の種類に応じて用いられる。そして、ホタル由来のものであれば、如何なるものでも用いることが可能であり、例えば、ゲンジボタル、ヘイケボタル等由来のものを用いることが可能である。

【0007】これらの遺伝子等は、すでに公知の方法に従って調製される。例えば、野生型ゲンジボタル遺伝子及びその組み換え体DNAは、特開平1-51086号公報に

10

20

30

40

50

記載の方法により調製することが可能である。本発明において、「ゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸」とは、確定したルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼのアミノ酸配列を比較した場合に、ゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意味するものである。

【0008】具体的には、既製のアミノ酸の相同性の解析用ソフト、例えば、Micro Genie™ (ベックマン社製)により、各々のルシフェラーゼのアミノ酸配列とゲンジボタル若しくはヘイケボタルのアミノ酸配列の相同性を比較することにより決定される。当該アミノ酸としては、例えば、スレオニン若しくはアラニンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0009】さらに、本発明において、「疎水性アミノ酸」としては、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン、システイン、又はアラニン等を挙げることができる。そして、これらの中でも、イソロイシン、ロイシン、又はバリンは、疎水性値が高いという点で特に好ましいものとして挙げることができる。

【0010】野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝子の変異処理は、企図する変異形態に応じた通常公知の方法で行ない得る。すなわち、野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝子あるいは当該遺伝子の組み込まれた組み換え体DNAと変異原となる薬剤とを接触・作用させる方法；紫外線照射法；遺伝子工学的な手法；又は蛋白質工学的な手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

【0011】上記変異処理に用いられる変異原となる薬剤としては、例えば、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン、蟻酸、5-ブロモウラシル等を挙げることができる。この接触・作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件を採ることが可能であり、現実に所望の変異を野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝子において惹起することができる限り特に限定されない。通常、好ましくは0.5~12Mの上記薬剤濃度において、20~80℃の反応温度下で10分以上、好ましくは10~180分間接触・作用させることで、所望の変異を惹起可能である。

【0012】紫外線照射を行なう場合においても、上記の通り常法に従うことができる(現代化学、pp24~30、1989年6月号)。蛋白質工学的な手法を駆使する方法としては、一般的に、サイトスペシフィック ミュータジェネシス(Site-Specific Mutagenesis)として知られる手法を用いることができる。例えば、Kramer法(Kramer, W. et al., Nucleic Acids Res, vol. 12, pp9441-9456 (1984) ; Kramer, W. et al., Methods Enzymol, vol. 154, pp350-367 (1987) ; Bauer, C. E. et al., Ge-

ne, vol. 37, pp73-81 (1985)), Eckstein法(Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res, vol. 13, pp. 8749-8764 (1985) ; Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res, vol. 13, 8765-8785(1985) ; Nakamaye, K. L. et al., Nucleic Acids Res, vol. 14, pp. 9679-9698 (1986))、Kunkel法(Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 82, pp488-492 (1985) ; Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol, vol. 154, pp. 367-382 (1987))等が挙げられる。

10 【0013】なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法又は酵素合成法により、直接所望の改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子を合成し得ることはもちろんである。上記方法により得られる所望のホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列の決定・確認は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法(Maxam-Gilbert, Meth. Enzym., vol. 65, pp. 499-560(1980))やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing et al., Gene, vol. 19, pp. 269-276(1982))等により行ない得る。

20 【0014】上述の如くして得られた耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、常法により、バクテリオファージ、コスミド、又は原核細胞若しくは真核細胞の形質転換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各々のベクターに対応する宿主を常法により、形質転換・形質導入をすることができる。例えば、宿主として、エッシャー・大腸菌(E. coli) JM101(ATCC 33876)、大腸菌(E. coli) DH1(ATCC 33849)、大腸菌(E. coli) HB 101(ATCC 33694)等を選択する場合には、ハナハン(Hana-han)の方法[ディー・エヌ・エイ・クローニング(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985)]等により形質転換するか、あるいは「モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第256~268頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)」記載の方法等により形質導入することにより形質転換株あるいは形質導入株を得ることが可能である。

30 【0015】そして、上記菌株より耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有する菌株をスクリーニングすることにより、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを含み、耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有するエッシャー・大腸菌(E. coli)属に属する菌株を得ることができる。このようにして得られた菌株より純化された新規な組み換え体DNAを得るには、例えばピー・グーリー(P. Guerry)等の方法[ジェイ・バクテリオロジー(J. Bacteriology)第116巻、第1064~1066頁(1973年)]、デー・ビー・クレウェル(D. B. Clewell)の方法[ジェイ・バクテリオロジー(J. Bacteriology)第110巻、第667~676頁(1972年)]、などにより得ることができる。

50 【0016】そして、このようにして得られた組み換え体DNAより耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む

するDNAを得るには、例えば、該プラスミドDNAに制限酵素、例えばEcoRI及びPst Iを温度30~40℃、好ましくは37℃程度で1~24時間、好ましくは2時間程度作用させて、反応終了液をアガロースゲル電気泳動法〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第150頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982)記載で処理することにより得ることができる。

【0017】上記のようにして得られた耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを含み、耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有するエッシャーシア属に属する菌株を用いて耐熱性ホタルルシフェラーゼを生産するには、この菌株を通常の固体培養法で培養してもよいが、可能な限り液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

【0018】また、上記菌株を培養する培地としては、例えば酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンステイプリカーあるいは大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0019】なお、培地の初発 pHは、pH 7~9に調整するのが適当である。また培養は30~42℃、好ましくは37℃前後で4~24時間、好ましくは6~8時間で、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物より耐熱性ホタルルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いて得ることができる。

【0020】例えば、常法により菌体を、超音波破壊処理、磨砕処理などするか、または、リゾチーム等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、またはトルエン等の存在下で振盪もしくは放置して自己消化を行わせ本酵素を菌体外に排出させることができる。そして、この溶液を濾過、遠心分離などして固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩、硫酸マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫安、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈澱物を採取し、粗酵素を得る。

【0021】上記粗酵素よりさらに精製酵素標品を得るには、例えばセファデックス、ウルトロゲルもしくはバイオゲル等を用いるゲル濾過法；イオン交換体を用いる吸着溶出法；ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法；ヒドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法；蔗糖密度勾配遠心法等の沈降法；アフィニティクロマト法；分子ふるい膜もしくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択し、またこれらを組合わせて実施することにより、精製された酵素標品を得ることが出来る。

【0022】このようにして、所望の耐熱性ホタルルシフェラーゼを得ることができる。そして、当該耐熱性ホタルルシフェラーゼは、以下に示す性質を除き、特開平1-141592号公報記載の野性型ゲンジボタルのルシフェラーゼ、又は特開平1-262791号公報記載のヘイケボタルのルシフェラーゼと同様である。

作用適温の範囲：0~65℃である。

pH、温度等による失活の条件：

i) pH4.0 以下又は pH12.0以上で4時間後完全に失活する。

【0023】ii) pH7.8 において温度65℃、60分間の熱処理により完全に失活する。

熱安定性：温度50℃、20分間の処理で80%以上の残存酵素活性を有し、温度50℃、60分間の処理でも65%以上の残存酵素活性を有する。

【0024】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。なお、以下に述べる項目1~10には、ホタルの1種であるフォティナス・ピラリスのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA（該DNAは、ルシオラ・クルシアタのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを検索する際、プローブとして使用されるものである。）の調製について述べる。

1. m-RNAの調製

ホタルの1種であるフォティナス・ピラリス(Photinus pyralis)の乾燥尾部（シグマ社製）1gを乳鉢及び乳棒を用いて充分破碎したものに、溶解緩衝液5ml〔20mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.4)/10mM NaCl/3mM酢酸マグネシウム/5% (w/v) ショ糖/1.2% (V/V) トリトンX-100/10mMバナジルヌクレオシド錯体（ニューイングランド バイオラボ社製）〕を添加し、更に、上記と同様に破碎してフォティナス・ピラリス尾部破碎物含有溶液を得た。

【0025】このようにして得た溶液5mlをカップ型ブレンダー（日本精機製作所社製）に入れ、5,000r.p.m. で5分間処理したものに、12mlのグアニジンイソチオシアネート溶液（6Mグアニジンイソチオシアネート/37.5mMクエン酸ナトリウム (pH7.0)/0.75% (W/V) N-ラウロイルザルコシナトリウム/0.15M β-メルカプトエタノール）を添加する。この溶液をさらに上記ブレンダーを用いて3,000r.p.m. で10分間処理し、3重のガーゼを用いて濾過して濾液を得た。次に、超遠心分離機用チューブ（日立工機社製）4本に、予め1.2mlの5.7Mの塩化セシウム溶液を夫々重層し、その上に、上記濾液を重層するように夫々分注し、超遠心分離機（日立工機社製、SCP55H）を用いて温度15℃、30,000r.p.m. で16時間遠心分離して沈澱物を得た。得られた沈澱物を、冷70% (V/V) エタノールを用いて洗浄し、10mMトリス緩衝液〔10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.4)/5mMEDTA/1%ドデシル硫酸ナトリウム〕4mlに懸濁したものに、

同量のn-ブタノール及びクロロフォルムを4対1(容量比)混液を添加して抽出し、常法により3,000r.p.m.で10分間遠心分離し、水層及び有機溶媒層に分離した。この有機溶媒層に上記10mMトリス緩衝液4mlを添加し、上記抽出及び分離操作を行なう操作を2回繰り返した。得られた水層に、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2倍量の冷エタノールを添加したものを温度-20℃で2時間放置したのち、常法により8,000r.p.m.で20分間遠心分離し、RNAを沈澱させた。得られたRNAを4mlの水に溶解し、上記エタノール沈澱操作を行なった。得られたRNAをさらに1mlの水に溶解し、3.75mgのRNAを得た。

【0026】そして、以上の操作を再度繰り返すことにより合計7mgのRNAを調製した。このRNA中よりm-RNAを選択するために、7mgのRNAを、オリゴ(dT)-セルロース(ニューイングランドバイオラボ社製)カラムクロマトグラムにかけた。このカラムクロマトグラムにおいて、カラムとして2.5mlテルモシリンジ(テルモ社製)を用いた。このカラムに、樹脂0.5gを溶出緩衝液[10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.6)/1mMEDTA/0.1%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム]で膨潤させたのち充填し、結合緩衝液[10mMトリス-塩酸(pH7.6)/1mMEDTA/0.4M NaCl/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム]で平衡化して調製した。

【0027】7mgのRNAに、同量の緩衝液[10mMトリス-塩酸(pH7.6)/1mMEDTA/0.8M NaCl/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム]を添加し、温度65℃で10分間加熱処理し、氷中で急冷した。これを前記調製したオリゴ(dT)-セルロースカラムにかけ、結合緩衝液で樹脂を洗浄し、未結合のr-RNA及びt-RNAを完全に洗浄し、更に、溶出緩衝液でm-RNAを溶出してm-RNA 40μgを得た。

2. ルシフェラーゼm-RNAの濃縮

次に、ショ糖密度勾配遠心分離法によりルシフェラーゼm-RNAを濃縮した。

【0028】10~25%(W/V)のショ糖密度勾配は、ベックマン社製のローターSW41用ポリアロマチューブに40%(W/V)ショ糖液[50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/20mMNaCl/1mMEDTA/40%(W/V)ショ糖]0.5mlを入れ、その上に2.4mlずつ25%(W/V)、20%(W/V)、15%(W/V)及び10%(W/V)のショ糖液を重ねし、4℃で24時間放置することにより作製した。このショ糖密度勾配に、m-RNA 30μgを重ねし、SW41ローター(ベックマン社製)を用い、常法により30,000r.p.m.、温度18℃で18時間遠心分離を行なった。遠心分離操作ののち、0.5mlずつ分画し、エタノール沈澱法によりm-RNAを回収し、10μLの水に溶解した。

【0029】次に、m-RNAにコードされている蛋白質を調べることにより、ルシフェラーゼのm-RNAが濃縮されている画分の同定を行なった。分画したRNA

1μL、ウサギ網状赤血球ライセート(アマシヤム社製)9μL及び³⁵S]メチオニン1μL(アマシヤム社製)を混合し、30℃で30分間反応させた。これに150μLのNET緩衝液[150mM NaCl/5mMEDTA/0.02%(W/V)NaN₃/20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)/0.05%(W/V)ノニデットP-40(ベセスダリサーチラボラトリー社製、界面活性剤)]を添加し、更に、1μLの抗ルシフェラーゼ血清(後述のようにして調製したもの)を添加し、4℃で18時間放置した。これに10mgのプロテインAセファロース(ファルマシア社製)を添加し、温度20℃で30分間放置したものを、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理し、樹脂を回収した。

【0030】回収した樹脂を200μLのNET緩衝液で3回洗浄し、次いで、40μLのSDS-PAGE用サンプル緩衝液[62.5mMトリス-塩酸緩衝液(pH6.8)/10%(V/V)グリセロール/2%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム/5%(V/V)メルカプトエタノール/0.02%(W/V)ブROMフェノールブルー]を添加し、温度100℃で3分間煮沸し、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理した。この遠心分離処理で得られた上清を回収し、全量を7.5%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルに乗せてラエムリ(Laemmli)の方法[「ネーチャー」(Nature)、第227頁、第680頁(1970)]でゲル電気泳動を行った。

【0031】ゲル電気泳動を行なった後のゲルを10%(V/V)の酢酸に30分間浸漬し、蛋白質を固定したのち、水に30分間浸漬し、更に、1Mサリチル酸ナトリウム溶液に30分間浸漬し、乾燥して乾燥ゲルを得、次いでX線フィルム(フジ写真フィルム社製、RX)を用いてフルオログラフィーを行なった。以上の操作により、ルシフェラーゼm-RNAの存在する画分のRNAを用いた場合にのみ、ルシフェラーゼ蛋白質のバンドがX線フィルム上に認められ、ルシフェラーゼm-RNAの濃縮されている画分が同定できた。

3. 抗ルシフェラーゼ血清の調製

精製ルシフェラーゼに対するウサギの抗ルシフェラーゼ血清は、以下の方法により調製した。

【0032】3.2mg/ml濃度のルシフェラーゼ溶液[シグマ社製ルシフェラーゼを0.5Mグリシルグリシン溶液(pH7.8)に溶解したもの]0.7mlを、等量のプロイント(Freund)完全アジェバントで懸濁したもの2.24mgを、抗原として体重2kgの日本白色種ウサギの指掌部に投与し飼育した。飼育2週間経過した後、初回と同量の抗原を背部皮内へ投与し、更に、飼育1週間経過したのち、同様の操作を行ない、更に、飼育1週間後全採血を行なった。

【0033】そして、得られた血液を、温度4℃で18時間放置したものを、常法により3,000r.p.m.で15分間遠心分離し、上清として抗ルシフェラーゼ血清を得た。

4. c-DNAの合成

c-DNAの合成は、アマシャム社製キットを用いて行なった。上述の如くして得られたm-RNA 2 μ gを用いてアマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」(Mol. Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及び「ジーン」(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従い処理して、300ngの2本鎖c-DNAを得た。

【0034】このc-DNA 150ngを7 μ LのTE緩衝液[10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/1mMEDTA]に溶解したものに、11 μ Lの混液[280mM カコジル酸ナトリウム(pH6.8)/60mM トリス-塩酸緩衝液(pH6.8)/2mM塩化コバルト]及び3.8 μ Lのディリング混液[10mMジチオスレイトール7.5 μ L /10ng/mlポリ(poly) A 1 μ L /5mM dCTP 2 μ L /水 110 μ L]を夫々添加し、更に、29ユニットのターミナルトランスフェラーゼ(ペーリンガー・マンハイム社製)を添加し、30℃で10分間反応させ、次いで、2.4 μ Lの0.25M EDTA及び2.4 μ Lの10% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウムを夫々添加して反応を停止させた。

【0035】この反応停止液に25 μ Lの水飽和フェノールを用いて除蛋白処理を行なった。回収した水層に、25 μ Lの4M酢酸アンモニウム及び100 μ Lの冷エタノールを夫々添加し、-70℃で15分間放置し、12,000 r.p.m.で10分間遠心分離してc-DNAを回収した。これを10 μ LのTE緩衝液に溶解し、c-DNA溶解液を得た。

【0036】以上の如くしてデオキシシチジンのテイルが付いたc-DNA 100ngを得た。

5. ベクターに使用する組み換え体プラスミド pMCE 10DNAの調製

大腸菌W3110株(ATCC 27325)、プラスミド pBR325(BRL社製)及びプラスミド pBR322 DNA(宝酒造社製)を用いてティー・マスダ等(T. Masuda et. al.)「アグリカルチュラル・バイオリジカル・ケミストリー」(Agricultural Biological Chemistry)、第50巻、第271~279頁(1986)記載の方法により作製したプラスミド pKN305 DNA並びにプラスミド pMC1403-3DNA(特開昭61-274683号公報記載)を作製した。夫々のプラスミド1 μ gを、10 μ Lの混液[50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/10mM MgCl₂/100mM NaCl/1mMジチオスレイトール]に添加し、更に、これに、HindIII及びS_{al}I(いずれも宝酒造社製)を夫々2ユニットずつ添加し、37℃で1時間反応させて切断処理し、常法によるフェノール抽出及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を得た。この沈澱物を、10 μ Lのライゲーション緩衝液[20mM MgCl₂/66mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.6)/1mM ATP/15mMジチオスレイトール]に溶解し、この溶液にさらに1ユニットのT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を添加し、20℃で4時間連結反応を行なった。次いで、この反応液を用い、「ジェイ・バクテリオロジー

(J. Bacteriology、第119巻、第1072頁~第1074頁(1974年))記載の形質転換法により、大腸菌JM 101(ATCC 33876)株を形質転換し、薬剤耐性(アンピシリン耐性及びテトラサイクリン感受性)及び β -ガラクトシダーゼ活性を検討し、形質転換株を得た。この形質転換株に含まれる組み換え体プラスミドDNAをpMCE 10と命名した。この組み換え体プラスミド pMCE 10DNAを含有する大腸菌JM101株を、トリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、及びNaCl0.5%(W/V)からなる培地1Lに、該培地を用い37℃で16~24時間前培養して得た大腸菌JM101(pMCE 10)の培養液20mlを接種し、37℃で3時間振盪培養したのち、0.2gのクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で20時間同培養を行ない、培養液を得た。

【0037】次いで、この培養液を、常法により6,000 r.p.m.で10分間遠心分離して湿潤菌体2gを得た。これを20mlの25%(W/V)ショ糖を含有する350mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁したのち、更に、これに、リゾチーム10mg、0.25M EDTA溶液(pH8.0) 8ml及び20%(W/V) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 8mlを夫々添加し、60℃で30分間保温して溶菌し、溶菌液を得た。

【0038】この溶菌液に、5M NaCl溶液13mlを添加し、温度4℃で16時間処理したものを常法により15,000 r.p.m.で30分間遠心分離して抽出液を得、常法によりフェノール抽出処理及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を得た。次いで、この沈澱物を通常の減圧乾燥処理した後、1mMEDTAを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液6ml(pH7.5)に溶解し、更に、これに、塩化セシウム6g及びエチジウムブロマイド溶液(10mg/ml) 0.2mlを添加した。これを超遠心分離機を用いて常法により39,000 r.p.m.で42時間平衡密度勾配遠心分離処理を行ない、組み換え体プラスミド pMCE 10DNA含有物を単離した。次いで組み換え体プラスミド pMCE 10DNA含有物からn-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除去したのち、1mMEDTAを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に対して透析を行ない純化した組み換え体プラスミド pMCE 10DNA 500 μ gを得た。

6. ベクターDNAの調製

以上の様にして得られた組み換え体プラスミド pMCE 10DNA 15 μ gを、前記項目4記載のTE緩衝液90 μ Lに溶解しMed緩衝液[100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM MgCl₂/10mMジチオスレイトール/500mM NaCl] 10 μ Lを添加したのち制限酵素A_{cc}I(宝酒造社製) 30ユニットを更に加え、37℃で1時間切断処理を行ない切断処理物を得た。この切断処理物に、100 μ Lの水飽和フェノールを加え除蛋白操作を行なったのち、水層を回収した。この水層に、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH7.5)及び2倍量の冷エタノールを加え、-70℃で15分間放置したのち、12,000 r.p.m.で10分間遠心分離し、DNAを回収した。

【0039】このDNAを、TE緩衝液10 μ L に溶かし、混液〔280mM カコジル酸ナトリウム(pH6.8)/60mM トリシュー塩酸緩衝液(pH6.8)/2mM塩化コバルト〕15 μ Lを加えたのち、更に、ティリング混液(項目4記載)(5mM dGTPを用いた)5 μ L 及びターミナルトランスフェラーゼ(宝酒造社製)5ユニットを添加し、37℃で15分間反応させた。前記項目4記載のc-DNAティリング反応と同様の後処理を行なうことにより組み換え体プラスミドpMCE10DNAのAccIサイトにデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAを調製した。

【0040】一方、プラスミドpUC19DNAのPstIサイ6にデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAの調製も同時に行なった。プラスミドpUC19DNA(宝酒造社製)30 μ gを、350 μ LのTE緩衝液に溶解したものに、40 μ LのMed緩衝液及び制限酵素PstI(宝酒造社製)120ユニットを夫々添加し、37℃で1時間切断処理したのち、常法によりフェノールによる除蛋白処理及びエタノール沈澱処理によりDNAを回収した。

【0041】得られたDNAを、35 μ LのTE緩衝液に溶解したものに、50 μ Lの混液〔280mM カコジル酸ナトリウム(pH 6.8)/60mMトリシュー塩酸緩衝液(pH6.8)/1mM塩化コバルト〕、19 μ Lの項目4記載のティリング混液(dGTP含有)並びに60ユニットのターミナルトランスフェラーゼ(宝酒造社製)を夫々添加し、37℃で10分間反応させたのち、常法によりフェノール処理及びエタノール沈澱を行なうことによりDNAを回収した。

7. アニール及び形質転換

合成したc-DNA15ng及び上記の方法で得た二種のベクターDNA 200ngを、35 μ Lのアニール緩衝液〔10mMトリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mMEDTA〕に溶解し、65℃で2分間、46℃で2時間、37℃で1時間及び20℃で18時間放置する操作によりc-DNAとベクターDNAをアニールした。

【0042】アニールしたDNAを用いて、ハナハン(Hana-han)の方法〔デーエヌエイクローニング(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985)〕により大腸菌DH1株(ATCC 33849)を形質転換し、プラスミドpUC19DNA及び組み換え体プラスミドpMCE10DNAをベクターとしたc-DNAバンクを夫々作製した。

8. ルシフェラーゼc-DNAの検索

組み換え体プラスミドpMCE10DNAのAccI部位は、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードする部位にあるので、この部位に組み込まれたc-DNAは β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を作った。また組み換え体プラスミドpMCE10の β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターは前述した様に大腸菌トリプトファン遺伝子のプロモーターに変換してある。

【0043】組み換え体プラスミドpMCE10DNAをベクターとするc-DNAバンクのコロニー96個をM9

カザミノ酸培地〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第440~441頁、「コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー」(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)〕にチアミン(10 μ g/ml)を加えた培地中、37℃で10時間振盪培養し、常法により集菌したのち、前記項目2記載のSDS-PAGE用サンプル緩衝液200 μ Lに懸濁し、100℃で5分間煮沸した。

【0044】この懸濁液40 μ Lを、7.5%(W/V)ポリアクリルアミドゲルを用いて、常法により電気泳動を行なった。泳動終了後、ゲルに展開した蛋白質を、ウェスタンブロット法〔「アナール・バイオケム」(Anal. Biochem.)、第112巻、第195頁(1981)〕によりニトロセルロースのフィルターに転写し、このニトロセルロースフィルターをイミュンブロットアッセイキット(バイオラッド社製)を用いて抗ルシフェラーゼ血清で染色した。この方法は、バイオラッド社の操作法に従った。

【0045】即ちニトロセルロースのフィルターを、ブロッキング溶液〔TBS緩衝液〔20mMトリシュー塩酸緩衝液/500mM NaCl(pH7.5)〕に3%(W/V)のゼラチンを溶かした溶液〕100ml中、25℃で、30分間振盪した。次に、このニトロセルロースフィルターを25mlの一次抗体溶液〔ルシフェラーゼ抗血清を1%(W/V)のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で25倍(V/V)に希釈した溶液〕に移し、25℃で90分間振盪した。これを100mlのツィーン(Tween)-20洗液〔TBS緩衝液に0.05%(W/V)のツィーン(Tween)-20を溶かした溶液〕中に移し、25℃で10分間振盪する操作を2回行なった。次いで、このようにして得たニトロセルロースフィルターを60mlの二次抗体溶液〔西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギ抗体(バイオラッド社製)を1%(W/V)のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で3000倍(V/V)に希釈した溶液〕中に移し、25℃で60分間振盪したのち、100mlのツィーン(Tween)-20洗液でニトロセルロースフィルターを洗う上記操作を2回繰り返した。このようにして得たニトロセルロースフィルターを、120mlの発色液〔60mgの4-クロロ-1-ナフトールを20mlの冷メタノールに溶解した溶液及び60 μ Lの30%(V/V)過酸化水素水を100mlのTBS緩衝液に添加した溶液を混合した溶液〕中に移し、25℃で10分間発色させた。

【0046】この様にして96個のコロニーを1グループとしたものの4グループについて、同様の方法を行なったところ、2つのグループでルシフェラーゼ抗血清で染まる蛋白質バンドが認められた。次に、この2つのグループに属する96個のコロニーを12個のコロニーずつ8グループに分け同様の操作を行なったところ夫々1グループに抗ルシフェラーゼ血清と反応する蛋白質が認められた。最後に、このグループに含まれる12個のコロニーを、1個のコロニーずつ同様の操作を行ないルシフェラーゼ抗血清と反応する蛋白質を作るコロニーを同定した。以上の操作によりルシフェラーゼc-DNAをもつ

2個のコロニーが得られた。この2個のコロニーより前記項目5記載の方法でプラスミドDNAを調製した。得られた組み換え体プラスミドDNAは、pALf 2 B 8及びpALf 3 A 6と夫々命名した。

9. 大きなルシフェラーゼc-DNAの検索-DNAのプロープの作製

組み換え体プラスミド pALf 3 A 6 DNA 100 μ gを、330 μ L のTE緩衝液に溶解し、これに40 μ L のLow緩衝液 [100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) / 100mM MgCl₂ / 10mMジチオスレイトール]、130ユニットのPst I (宝酒造社製)及び120ユニットのSacI (ベアリングマンハイム社製)を添加し、37℃で1.5時間切断した。

【0047】このDNA全量を0.7%(W/V)アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。アガロースゲル電気泳動はティー・マニアテス(T. Maniatis)等の方法 [「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第156~161頁、「コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー」(Cold Spring Harbor Laboratory) (1984)]に従って行なった。ルシフェラーゼc-DNAを含むDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、2mlのTE緩衝液を加えたのち、透析チューブをシールし、電気泳動により、ゲル中より緩衝液中にDNAを溶出した。この溶液に等容量の水飽和フェノールを加え、攪拌したのち、水層を回収し、常法に従いエタノール沈澱によりDNAを回収した。

【0048】得られたDNAフラグメント10 μ gを、126 μ LのTE緩衝液に溶かし、Med緩衝液16 μ L及びSau 3 AI (宝酒造社製)64 ユニットの添加、37℃で2時間反応させたのち、その全量を5%(W/V)ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にかけて、DNA断片の分離を行なった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、エイ・マクサム(A. Maxam)の方法 [「メソズ・イン・エンザイモロジー」(Methods in Enzymology)、第65巻、第506頁(1980)]に従って行なった。190bpのDNAフラグメントを前述と同様の方法で単離し、1 μ gのSau 3 AIルシフェラーゼc-DNAフラグメントが得られた。

【0049】この1 μ gのルシフェラーゼc-DNAを、[α -³²P] dCTP (アマシャム社製)を用いてニックトランスレーション法により標識した。ニックトランスレーションは宝酒造社製のキットを用い、宝酒造社の指示する [「ジェイ・モル・バイオル」(J. Mol. Biol.)、第113巻、第237~251頁(1977)]及び [「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第109~112頁、「コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー」(Cold Spring Harbor Laboratory) (1982)]記載の方法に従って行なった。

10. 大きなルシフェラーゼc-DNAの検索-コロニーハイブリダイゼーション

前述の方法で調製した³²Pで標識したルシフェラーゼc-DNA断片を、プローブとして用い、組み換え体プラ

スミド pUC19DNAをベクターとするフォティナス・ピラリス尾部c-DNAバンクを、コロニーハイブリダイゼーション法 [「蛋白質・核酸・酵素」、第26巻、第575~579頁(1981)]で検索し、ルシフェラーゼc-DNAを有するコロニーを得た。そのうちの1個のコロニーの有する組み換え体プラスミドDNAをpALf 3と命名し、前記項目5記載の方法でプラスミドDNAを調製した。該組み換え体プラスミドDNAを含有する大腸菌を大腸菌DH1 (pALf 3)と命名した。なお、該形質転換大腸菌はATCC67462として寄託されている。

【0050】そして、上記組み換え体プラスミドpALf 3 DNAを、XbaI、HindIII、BamHI、EcoRI及びPstI (いずれも宝酒造社製)を用いて、単一消化及び2重消化した。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により移動度パターン分析し、得られた移動度パターンと λ DNA (宝酒造社製)をHind IIIにより消化して得られたDNA断片の標準移動度パターンとを対比した。この結果、得られた分子量は1,700bpであった。そして、上記プラスミドの制限酵素地図は、図1に示すとおりであった。

11. ルシオラ・クルシアタ (Luciola cruciata) のm-RNAの調製

生きたルシオラ・クルシアタ (ゲンジボタル・株式会社・西武百貨店より購入) 10gを超低温冷凍庫に入れ、凍結し、はさみを用いて尾部を切り離し、得られた尾部2gに、18mlのグアニジンイソチオシアネート溶液を添加し、前記項目1記載の方法に従って1.1mgのRNAを調製した。このRNA 1.1mgを前記項目1記載の方法に従ってオリゴ(dT)-セルロースのカラムクロマトグラフィーを行ない30 μ gのルシオラ・クルシアタ尾部m-RNAを調製した。

12. ルシオラ・クルシアタ尾部c-DNAバンクの作製
c-DNAの合成はアマシャム社より購入したキットを用い、アマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」(Mol. Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及び「ジーン」(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従って合成した。

【0051】2 μ gのルシオラ・クルシアタ尾部RNAより0.9 μ gの二本鎖c-DNAが合成された。このc-DNA 0.3 μ gに前記項目4記載の方法を用いてポリデオキシシチジンのテイルを付加した。このc-DNA 20ngと前記項目6で調製したポリグアナシンのテイルをそのPstI部位に付加したpUC19プラスミドDNA 500ngとを、前記項目7記載の方法でアニールし、得られるDNAで大腸菌DH1株 (ATCC 33849)をハナハン(Hanahan)の方法 [「ディエヌエイ・クローニング」(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985)]で形質転換し、ルシオラ・クルシアタ尾部c-DNAバンクを作製した。

13. ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼc-D

NAの検索

前記項目10で得られた組み換え体プラスミド pA Lf 3 DNA 10 μ g を、TE緩衝液90 μ L に溶解し、Med緩衝液10 μ L、制限酵素 EcoRI 25ユニット及び制限酵素の ClaI (いずれも宝酒造社製) 25ユニットを添加し、37℃で2時間反応を行ないDNAを切断した。切断した組み換え体プラスミド pA Lf 3 DNAよりフォテナス・ピラリス (アメリカホテル) 由来のルシフェラーゼ c-DNA部分を含む 800bpの EcoRI/ClaI DNAフラグメントを、前記項目9記載のアガロースゲル電気泳動法を用いる方法に従って単離し、1 μ g の EcoRI/ClaI DNAフラグメントを得た。このDNA 1 μ g を、[α - 32 P] dCTP三リン酸 (アマシャム社製) を用いて前記項目9記載のニックトランスレーション法により 32 Pで標識した。 32 Pで標識した EcoRI/ClaI DNAフラグメントをプローブとして、ルシオラ・クルシアタ尾部 c-DNAバンクを項目10記載のコロニーハイブリダイゼーション法で検索することによりルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ c-DNAを有する大腸菌を選択した。その結果、プローブとハイブリダイズする大腸菌コロニーを数個得た。この中の1コロニーの有する組み換え体プラスミドDNAを pG Lf 1 と命名し、前記項目5記載の方法に従い組み換え体プラスミドDNAを単離した。該組み換え体プラスミドDNAを含有する大腸菌を大腸菌DH1 (pG Lf 1) と命名した。なお、該形質転換株はATCC67482として寄託されている。

【0052】組み換え体プラスミドpG Lf 1 DNAを HpaI, HindIII, EcoRV, DraI, AflIII, HincII, PstI (いずれも宝酒造社製) 及 SspI (ニューイングランドバイオラボ社製) を用い、単一消化及び二重消化した。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により移動度パターン分析し、得られた移動度パターンと λ ファージDNA (宝酒造社製) を HindIII により消化して得られたDNA断片の標準移動度パターンとを対比した。その結果、得られた分子量は、2,000bpであった。そして、上記プラスミドの制限酵素地図は図2に示す通りである。

14. ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ c-DNAの塩基配列の解析

組み換え体プラスミド pG Lf 1 DNA 10 μ g を制限酵素 PstI (宝酒造社製) で切断し、ルシフェラーゼ c-DNAを含む2.0Kb DNA断片を2.5 μ g を得た。このDNA断片を、プラスミドpUC119DNA (宝酒造社製) の PstI 部位にクローニングし、得られたプラスミドDNAはc-DNAの挿入方向の違いにより夫々 pG Lf 2 及び pG Lf 3 と命名した。組み換え体プラスミド pG Lf 1 DNA及びプラスミド pUC119 DNAの PstI による切断処理 (前記項目6記載の方法)、ルシフェラーゼ c-DNA断片のアガロースゲル電気泳動法を

用いた単離 (前記項目9記載の方法)、プラスミド pUC119 DNA及びルシフェラーゼ c-DNA断片の連結反応 (前記項目5記載の方法)、連結反応液を用いた大腸菌 JM101 株 (ATCC 33876) の形質転換 (前記項目5記載の方法)、並びに組み換え体プラスミド pG Lf 2 及び pG Lf 3 DNAの調製 (前記項目5記載の方法) は、それぞれ前述の方法に従った。

【0053】次いで、組み換え体プラスミド pG Lf 2 及び pG Lf 3 DNAを用いてキロシークエンス用欠失キット (宝酒造社製) により、ヘニコフ (Henikoff) の方法 [「ジーン」 (Gene)、第28巻、第351~359 (1984)] に従いルシフェラーゼ c-DNAに種々の欠失が導入されたプラスミドDNAを作製した。これらプラスミドDNAを前記項目5記載の方法で大腸菌 JM101 株 (ATCC 33876) に導入した。このようにして得られた大腸菌にペルパーファージM13KO7 (宝酒造社製) を感染させ、メッシング (Messing) の方法 [「メソズ・イン・エンザイモロジー」 (Methods in Enzymology)、第101巻、第20~78頁 (1983)] に従って1本鎖DNAを調製した。得られた1本鎖DNAによるシークエンシングは、M13シークエンシングキット (宝酒造社製) を用いて上記メッシング (Messing) の方法に従い行なった。塩基配列の解析のためのゲル電気泳動は8% (W/V) ポリアクリルアミドゲル (富士写真フィルム社製) を用いて行なった。

【0054】得られたルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ c-DNAのみの全塩基配列を配列番号1に、また、当該c-DNAから翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に夫々示した。

15. 組み換え体プラスミド pG Lf 37 DNAの構築

30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

まず、N末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配列を欠失し、ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ遺伝子及びベクターDNAを含有するDNA断片の調製について述べる。組み換え体プラスミド pG Lf 1 DNA 1 μ g を、水90 μ Lに溶解したものに、Med緩衝液10 μ L及び PstI (宝酒造社製) 20ユニットを添加し、37℃で2時間消化する。得られた消化物に、等量の水飽和フェノールを添加し、常法による除蛋白処理及びエタノール沈殿処理を行った。得られた沈殿物を前記項目5に記載の方法にて、ライゲーションし、次いで大腸菌 JM101 (ATCC33876) へ形質転換を行った。

【0055】得られた形質転換体から前記項目5に記載の方法によりDNAを単離した。これを SspI、EcoRV 及び PstI の制限酵素で単一又は二重消化して、もとの組み換え体プラスミド pG Lf 1 に対してc-DNAの向きが逆向きになっている組み換え体プラスミドを選択し、pG Lf 10と命名した。組み換え体プラスミド pG Lf 10 DNA 10 μ g を、水90 μ Lに溶解したものに、Med緩衝液10 μ L及び SspI (ニューイングランドバイオラボ社製) 10ユニットを添加し、37℃で30分処理し、部分分解物を得た。この部分分解物より前記項目9記載

の方法により、N末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配列を欠失したルシフェラーゼ遺伝子及びベクターDNAの大部分を含有する4.0 KbのDNA断片2 μ gを単離した。

【0056】次に、このDNA断片1 μ gを水95 μ Lに溶解したものに、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 5 μ L及びアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製) 0.3ユニット(1 μ L)を添加し、65℃で1時間処理し、常法による除蛋白処理及びエタノール沈澱処理したのち、両端を脱リン酸した4.0 KbのDNA断片を1 μ g得た。

【0057】次に、大腸菌由来のトリプ(trp)プロモーターを含有するDNA断片の調製法について述べる。トリププロモーターを含有するプラスミド pKN206 DNA〔「アグリク・バイオル・ケム」(Agric. Biol. Chem.), 第50巻、第271～279頁(1986年)記載のもの〕10 μ gを、水90 μ Lに溶解し、Med緩衝液10 μ L及びC1aI(宝酒造社製)20ユニットを添加し、37℃で2時間処理し、完全分解物を得た。これに前述のSspI 10ユニットを添加し、温度37℃で30分間処理し、SspIによる部分分解物を得た。これを常法による除蛋白処理及びエタノール沈澱処理したのち、得られた沈澱を100 μ LのTE緩衝液に溶解し、前記項目9記載の方法により、トリププロモーターの大部分を含有する500bのDNA断片を単離した。

【0058】次に合成DNAの調製について述べる。上記4.0 KbのDNA断片に含まれるルシフェラーゼ遺伝子は、塩基配列より推定したところN末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配列を欠失している。また、上記500bのDNA断片に含まれるトリププロモーターは、SDとATG間の塩基配列の一部を欠失している。そこで、ルシフェラーゼのN末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配列及びトリププロモーターのSD-ATG間の塩基配列を補うために、以下の2種の合成DNA

(配列番号3及び配列番号4)をベグマン社製のシステム1プラスDNA合成機を用いて合成した。

【0059】これらの2種の合成DNAをデュボン社製のネンソルブ・プレップ(NENSORB PREP)を用いることにより、20 μ gの精製された合成DNAを夫々得た。これら2種の合成DNA 1 μ gを夫々水45 μ Lに溶解し、X10カイネーション緩衝液[0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH7.6)/0.1M MgCl₂/50mMジチオスレイトール/10mMATP] 5 μ Lを添加し、更に、T4ポリヌクレオチドポリメラーゼ(宝酒造社製)10ユニット(1 μ L)を添加したのち温度37℃で1時間処理した。これを常法による除蛋白処理及びエタノール沈澱処理を行い、5'末端をリン酸化した合成DNAをそれぞれ1 μ gずつ得た。

【0060】次に、ライゲーション反応により目的のプラスミドDNAの取得を行った。上記の脱リン酸化したN末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配列を欠失したルシフェラーゼ遺伝子、ベクターDNAを含む4.0

KbのDNA断片1 μ g、上記のトリププロモーターを含む500bのDNA断片1 μ g及び上記2種のリン酸化した合成DNA 0.1 μ gを夫々8 μ Lの水に溶解した。これにX10ライゲーション緩衝液[200mM MgCl₂/660mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)/10mMATP/150mMジチオスレイトール] 1 μ Lの及びT4 DNAライゲース(宝酒造社製)1ユニット(1 μ L)を添加し、温度16℃にて16時間反応を行った。得られた反応液を用いて前記項目5に記載の方法にて大腸菌JM101(ATCC 33876)へ形質転換を行い、得られた形質転換体より、前記項目5に記載の方法にてプラスミドDNAを単離し、SspI、EcoRV及びPstIの制限酵素で単一又は二重消化した。これを、0.7%アガロースゲル電気泳動にて展開し、トリププロモーターによりルシフェラーゼ遺伝子を完全にコードするルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドを得、該組み換え体プラスミドを、pGLf 37と命名した。また、該プラスミドを含有する大腸菌は大腸菌JM101(pGLf 37)と命名した。

16. 組み換え体プラスミド pGLf 37 DNAの変異

20 組み換え体プラスミド pGLf 37 DNA 30 μ gを、ヒドロキシルアミン溶液[0.8M塩酸ヒドロキシルアミン/0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)/1mMEDTA] 100 μ Lに溶解し、65℃で2時間変異処理したのち、常法によりエタノール沈澱を行い沈澱物を回収した。この沈澱物をTE緩衝液[10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)/1mMEDTA]に溶解し、ハナハン(Hana-han)の方法[ディーエヌエイ・クローニング(DNA Cloning)、第1巻、第109～135頁(1985)]により、大腸菌JM101株(ATCC 33876)を形質転換し、LB-amp寒天培地[バクトトリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)、アンピシリン(50 μ g/ml)及び1.4%(W/V)寒天]に接種し、37℃で培養した。12時間後、出現してきたコロニーをLB-amp培地[バクトトリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)、及びアンピシリン(50 μ g/ml)] 3ml中、37℃で18時間振盪培養を行った。この培養液0.5mlを10mlの上記LB-amp培地に接種し、37℃で4時間振盪培養したのち、8000r.p.m.で10分間の遠心分離操作により湿潤菌体を夫々20mgずつ得た。

40 【0061】回収した菌体を、0.1M KH₂PO₄ (pH7.8)、2mMEDTA、1mMジチオスレイトール、及び0.2mg/mlプロタミン硫酸からなる緩衝液0.9mlに懸濁し、更に、これに、10mg/mlのリゾチーム溶液100 μ Lを添加し、氷中に15分間放置した。次に、この懸濁液を、メタノール、ドライアイス浴中で凍結し、次いで温度25℃に放置し、完全に解凍した。更に、12000r.p.m.で5分間遠心分離操作を行うことにより、上清として粗酵素1mlを得た。

50 【0062】このようにして得られたルシフェラーゼを含む粗酵素液を50℃で10分間熱処理し、その中の10 μ Lについて、特開平1-141592号公報記載の方法で力価の測

定を行った。その結果野生型ゲンジボタルルシフェラーゼより熱安定性に優れているものを得た。更に、この粗酵素液を特開平1-141592号公報記載の方法で精製し、上記の方法で熱処理し、力価を測定した結果、野生型の精製ルシフェラーゼより熱安定性に優れていることが判明した。以上の如くして得られた耐熱性ルシフェラーゼをコードする遺伝子の組み込まれた組み換え体プラスミドDNAをpGLf37 T-M-2と命名し、該組み換え体プラスミドDNAで形質転換された大腸菌、すなわち大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37 T-M-2) は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第3452号 (FERM BP-3452) として寄託されている。

【0063】なお、このようにして得られた変異型ホタルルシフェラーゼは野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において217位のスレオニンがイソロイシンに置換されている。精製した本酵素100キロカウント (Kcount) 含有する酵素液100 μ l [10%飽和硫酸アンモニウム、0.2mM エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム及び0.2% (w/v) アルブミンを含有する10mMリン酸緩衝液 (pH 7.6)] を温度50℃で60分間保持して残存する酵素活性を測定した。その結果本酵素は上記条件で65%の残存酵素活性を保持していた。

【0064】なお、対照として野生型ホタルルシフェラーゼについても上記と同様にして残存酵素活性を測定したところ活性は確認できなかった。

17. 部位特異的変換

次にゲンジボタルルシフェラーゼの217番目のスレオニンを疎水性のアミノ酸であるバリン及びロイシンに変換させる方法を記載する。

【0065】組み換え体プラスミドpGLf37 DNA 10 μ g を制限酵素EcoRI, PstI (いずれも宝酒造社製) で二重消化し、ルシフェラーゼc-DNAを含む2.1kb DNA断片2.5 μ gを得た。このDNA断片をプラスミドpUC119 DNA (宝酒造社製) にサブクローンし、得られたプラスミドDNAをpGPM-1と命名した。次いで組み換え体プラスミドpGPM-1を項目5記載の方法で大腸菌JM101 (ATCC 33876) に導入した。このようにして得られた大腸菌にヘルパーファージM13K07 (宝酒造社製) を感染させることにより、メッシング (Messing) の方法 [メソズイン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第101巻、第20~78項 (1983)] に従って1本鎖DNAを調製した。得られた1本鎖DNAによる部位特異的変換は、インビトロ ミュータジェネシス システム バージョン2.0 (アマシャム社製) を用いて行った。なお、部位特異的変換のプライマーとして用いる為に、以下の2種に合成DNAを項目15記載の方法で合成した。すなわち、バリン用のプライマーとして配列番号5に示す合成DNAを、ロイシン用のプライマーとして配列番号6に示す合成DNAを部位特異的変異に供するプライマーとして夫々用いた。

【0066】また、部位特異的変換遺伝子のシーケンシングは、ダイプライマー タックシーケンシングキット (アプライド バイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、ABI373A DNAシーケンサー (アプライド バイオシステムズ社製) で泳動、解析を行った。このようにして得られた部位特異的変換遺伝子は、野生型ホタルルシフェラーゼの217番目のアミノ酸がバリン、ロイシンに変換されているアミノ酸配列をコードしており、前者をpGPM-1-Val、後者をpGPM-1-Leuと命名した。

10 【0067】次に部位特異的遺伝子pGPM-1-Val DNA及びpGPM-1-Leu DNA 10 μ g を制限酵素EcoRI, PstI (いずれも宝酒造社製) で二重消化し、ルシフェラーゼc-DNAを含む2.1kb DNA断片を、夫々2.5 μ gずつ得た。これらのDNA断片を夫々組み換え体プラスミドpGLf37 DNAを制限酵素EcoRI, PstI (いずれも宝酒造社製) で二重消化して得たルシフェラーゼc-DNAを含まないベクター部分にクローニングして得られたプラスミドDNAをpGLf37-217Val, pGLf37-217Leuと命名した。

20 【0068】次いで、組み換え体プラスミドpGLf37-217Val 及びpGLf37-217Leu を項目5記載の方法で大腸菌JM101株 (ATCC 33876) に導入し、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Val) 及び大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Leu) を得た。なお、これらの形質転換体のうち、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Val) は、微工研条寄第3647号 (FERM BP-3647) として、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Leu) は微工研条寄第3648号 (FERM BP-3648) として、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。これらの形質転換体より項目16記載の方法により粗酵素液を得、更にこの粗酵素液を特開平1-141592号公報記載の方法で精製した。このようにして得られた精製ルシフェラーゼを50℃で60分間熱処理し、その中の10 μ l について特開平1-141592号公報記載の方法で残存する酵素活性を測定したところ、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Val) 由来ルシフェラーゼは、65%残存酵素活性を保持し、また、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pGLf37-217Leu) 由来ルシフェラーゼは、70%残存酵素活性を保持していた。

18. 組み換え体プラスミド pHlf7 DNA の変異

40 次にヘイケボタル (ルシオラ・ラテラリス (*Luciola lateralis*)) のルシフェラーゼの217番目のアラニンを疎水性のアミノ酸であるバリン、ロイシン及びイソロイシンに変換させる方法を記載する。

【0069】特開平2-171189号公報記載の方法で取得した組み換え体プラスミド pHlf7 を項目5記載の方法で大腸菌JM101 (ATCC 33876) に導入した。なお、得られたルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼc-DNAのみの全塩基配列を配列番号7に、また、当該c-DNAから選定されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号8に夫々示した。このようにして得られた大腸菌より項目

17記載の方法で1本鎖DNAを調製した。得られた1本鎖DNAによる部位特異的変換は、インビトロミュータジェネシスシステム バージョン2.0 (アマシャム社製)を用いて行なった。なお部位特異的変換のプライマーとして用いる為に、以下の3種の合成DNAを項目15記載の方法で合成した。すなわち、バリン用のプライマーとして配列番号9に示す合成DNAを、ロイシン用プライマーとして配列番号10に示す合成DNAを、イソロイシン用のプライマーとして配列番号11に示す合成DNAを部位特異的変異に供するプライマーとして夫々用いた。また部位特異的変異遺伝子のシーケンシングは、ダイプライマー タックシーケンシングキット (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行ない、ABI 373A DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行なった。このようにして得られた組み換え体プラスミドにおけるルシフェラーゼの部位特異的変換遺伝子は、野生型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアミノ酸に相当する遺伝子部分がバリン、ロイシン、イソロイシンに変換されているアミノ酸をコードしており、夫々pHLf7-217Val、pHLf7-217Leu、pHLf7-217Ileと命名した。

【0070】次いで、組み換え体プラスミドpHLf7-217Val、pHLf7-217Leu、pHLf7-217Ileを項目5記載の方法で大腸菌 JM101株 (ATCC 33876)に導入し、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-217Val)、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-217Leu)、及び大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-217Ile)、を得た。なお、これらの形質転換体のうち、大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-217Val)は、微工研条寄第3839号 (FERM BP-3839)として；大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-217Leu)は、微工研条寄第3840号 (FERM BP-3840)として；大腸菌 (*E. coli*) JM101 (pHLf7-21

* 7Ile)は、微工研条寄第3841号 (FERM BP-3841)として、夫々工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。これらの形質転換体より項目16記載の方法により粗酵素液を得、更に、この粗酵素液を特開平1-262791号公報記載の方法で精製した。このようにして得られた精製ルシフェラーゼを50℃で60分間熱処理し、その中の10μlについて特開平1-262791号公報記載の方法で残存する酵素活性を測定したところ、すべて65%以上の残存活性を保持していた。

10 【0071】上記より明らかな如く本発明は、対照に比し著しく耐熱性を有するルシフェラーゼであることが判った。

【0072】

【発明の効果】本発明により耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子、この遺伝子を組み換え体DNA及び該組み換え体DNAを含む微生物により耐熱性ホタルルシフェラーゼを製造する方法並びにそのようにして得られた新規な耐熱性ホタルルシフェラーゼが提供された。そして、本発明の方法により、耐熱性ホタルルシフェラーゼを効率よく生産することができるので、本発明は産業上極めて有用である。

【0073】

【配列表】1. 配列番号1

- (1) 配列の長さ：1644
- (2) 配列の型：核酸
- (3) 鎖の数：一本鎖
- (4) トポロジー：直鎖状
- (5) 配列の種類：cDNA to mRNA
- (6) 起源：ルシオラ・クルシアタ
- (7) 配列：

30

```

ATG GAA AAC ATG GAA AAC GAT GAA AAT ATT GTA GTT GGA CCT AAA 45
CCG TTT TAC CCT ATC GAA GAG GGA TCT GCT GGA ACA CAA TTA CGC 90
AAA TAC ATG GAG CGA TAT GCA AAA CTT GGC GCA ATT GCT TTT ACA 135
AAT GCA GTT ACT GGT GTT GAT TAT TCT TAC GCC GAA TAC TTG GAG 180
AAA TCA TGT TGT CTA GGA AAA GCT TTG CAA AAT TAT GGT TTG GTT 225
GTT GAT GGC AGA ATT GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTT 270
TTT ATT CCT GTA ATA GCC GGA CTG TTT ATA GGT GTA GGT GTT GCA 315
CCC ACT AAT GAG ATT TAC ACT TTA CGT GAA CTG GTT CAC AGT TTA 360
GGT ATC TCT AAA CCA ACA ATT GTA TTT AGT TCT AAA AAA GGC TTA 405
GAT AAA GTT ATA ACA GTA CAG AAA ACA GTA ACT ACT ATT AAA ACC 450
ATT GTT ATA CTA GAT AGC AAA GTT GAT TAT CGA GGA TAT CAA TGT 495
CTG GAC ACC TTT ATA AAA AGA AAC ACT CCA CCA GGT TTT CAA GCA 540
TCC AGT TTC AAA ACT GTG GAA GTT GAC CGT AAA GAA CAA GTT GCT 585
CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCT ACC GGT TTG CCA AAA GGC GTA 630
CAA CTT ACT CAC GAA AAT ACA GTC ACT AGA TTT TCT CAT GCT AGA 675
GAT CCG ATT TAT GGT AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACC GCT GTT TTA 720
ACT GTC GTT CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTC ACT ACT CTA 765
GGG TAT TTA ATT TGT GGT TTT CGT GTT GTA ATG TTA ACA AAA TTC 810
GAT GAA GAA ACA TTT TTA AAA ACT CTA CAA GAT TAT AAA TGT ACA 855

```

23

24

AGT GTT ATT CTT GTA CCG ACC TTG TTT GCA ATT CTC AAC AAA AGT 900
 GAA TTA CTC AAT AAA TAC GAT TTG TCA AAT TTA GTT GAG ATT GCA 945
 TCT GGC GGA GCA CCT TTA TCA AAA GAA GTT GGT GAA GCT GTT GCT 990
 AGA CGC TTT AAT CTT CCC GGT GTT CGT CAA GGT TAT GGT TTA ACA 1035
 GAA ACA ACA TCT GCC ATT ATT ATT ACA CCA GAA GGA GAC GAT AAA 1080
 CCA GGA GCT TCT GGA AAA GTC GTG CCG TTG TTT AAA GCA AAA GTT 1125
 ATT GAT CTT GAT ACC AAA AAA TCT TTA GGT CCT AAC AGA CGT GGA 1170
 GAA GTT TGT GTT AAA GGA CCT ATG CTT ATG AAA GGT TAT GTA AAT 1215
 AAT CCA GAA GCA ACA AAA GAA CTT ATT GAC GAA GAA GGT TGG CTG 1260
 CAC ACC GGA GAT ATT GGA TAT TAT GAT GAA GAA AAA CAT TTC TTT 1305
 ATT GTC GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAC CAA 1350
 GTA CCA CCT GCC GAA TTA GAA TCC GTT CTT TTG CAA CAT CCA TCT 1395
 ATC TTT GAT GCT GGT GTT GCC GGC GTT CCT GAT CCT GTA GCT GGC 1440
 GAG CTT CCA GGA GCC GTT GTT GTA CTG GAA AGC GGA AAA AAT ATG 1485
 ACC GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAT GTT GCA AGT CAA GTT TCA AAT 1530
 GCA AAA CGT TTA CGT GGT GGT GTT CGT TTT GTG GAT GAA GTA CCT 1575
 AAA GGT CTT ACT GGA AAA ATT GAC GGC AGA GCA ATT AGA GAA ATC 1620
 CTT AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG 1644

2. 配列番号2

(1) 配列の長さ: 548

20

(2) 配列の型: アミノ酸

(3) トポロジー: 直鎖状

(4) 配列の種類: ペプチド

(5) 配列の起源: ルシオラ・クルシアタ

(6) 配列:

25

10
 Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile
 20
 Val Val Gly Pro Lys Pro Phe Tyr Pro Ile
 30
 Glu Glu Gly Ser Ala Gly Thr Gln Leu Arg
 40
 Lys Tyr Met Glu Arg Tyr Ala Lys Leu Gly
 50
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Val Thr Gly
 60
 Val Asp Tyr Ser Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu
 70
 Lys Ser Cys Cys Leu Gly Lys Ala Leu Gln
 80
 Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 90
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe
 100
 Phe Ile Pro Val Ile Ala Gly Leu Phe Ile
 110
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile
 120
 Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu
 130
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser
 140
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr
 150
 Val Gln Lys Thr Val Thr Thr Ile Lys Thr
 160
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
 170
 Arg Gly Tyr Gln Cys Leu Asp Thr Phe Ile
 180
 Lys Arg Asn Thr Pro Pro Gly Phe Gln Ala
 190
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asp Arg
 200
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser
 210
 Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 220
 Gln Leu Thr His Glu Asn Thr Val Thr Arg
 230

26

Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly
 240
 Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Val Leu
 250
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly
 260
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Ile Cys
 270
 Gly Phe Arg Val Val Met Leu Thr Lys Phe
 280
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln
 290
 Asp Tyr Lys Cys Thr Ser Val Ile Leu Val
 300
 Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Lys Ser
 310
 Glu Leu Leu Asn Lys Tyr Asp Leu Ser Asn
 320
 Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
 330
 Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala
 340
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln
 350
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala
 360
 Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys
 370
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu
 380
 Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr
 390
 Lys Lys Ser Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly
 400
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
 410
 Lys Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr
 420
 Lys Glu Leu Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu
 430
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu
 440
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu
 450
 Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln

460
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu
 470
 Leu Gln His Pro Ser Ile Phe Asp Ala Gly
 480
 Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Val Ala Gly
 490
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu
 500
 Ser Gly Lys Asn Met Thr Glu Lys Glu Val
 510
 Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn
 520
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe
 530
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 540
 Lys Ile Asp Gly Arg Ala Ile Arg Glu Ile

Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

3. 配列番号3

*

(6) 配 列 : CGA CAA TGG AAA ACA TGG AAA ACG ATG AAA AT

4. 配列番号4

※(3) 鎖の数 : 一本鎖

(1) 配列の長さ: 30

(4) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列の型 : 核酸

※ (5) 配列の種類: 他の核酸 合成DNAプライマー

(6) 配 列 : ATT TTC ATC GTT TTC CAT GTT TTC CAT TGT

5. 配列番号5

★(3) 鎖の数 : 一本鎖

(1) 配列の長さ: 38

(4) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列の型 : 核酸

★ (5) 配列の種類: 他の核酸 合成DNAプライマー

(6) 配 列 : CTC TAG CAT GCG AAA ATC TAG TGA CTA CAT TTT CGT GA

6. 配列番号6

☆(3) 鎖の数 : 一本鎖

(1) 配列の長さ: 38

(4) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列の型 : 核酸

☆ (5) 配列の種類: 他の核酸 合成DNAプライマー

(6) 配 列 : CTC TAG CAT GCG AAA ATC TAG TGA CGA CAT TTT CGT GA

7. 配列番号7

(1) 配列の長さ: 1644

(2) 配列の型: 核酸

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: cDNA to mRNA

40

(6) 配列の起源: ルシオラ・ラテラリス

(7) 配列:

29

80
 ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT
 60
 GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT
 90
 GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC
 120
 AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA
 150
 GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT
 180
 GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA
 210
 AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG
 240
 AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT
 270
 GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC
 300
 TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA
 330
 GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT
 360
 TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA
 390
 GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT
 420
 TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT
 450
 GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC
 480
 ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT
 510
 AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT
 540
 AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA
 570
 TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC
 600
 AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT
 630
 TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG
 660
 CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA
 690

30

TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA
 720
 AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA
 750
 ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT
 780
 ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT
 810
 GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT
 840
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA
 870
 GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA
 900
 CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT
 930
 GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT
 960
 TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT
 990
 TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT
 1020
 AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA
 1050
 GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA
 1080
 ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA
 1110
 CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA
 1140
 TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT
 1170
 AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA
 1200
 GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG
 1230
 AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA
 1260
 AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG
 1290
 CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA
 1320
 GAA AAA CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG
 1350
 AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA

1380
 GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT
 1410
 TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT GCC GGC
 1440
 GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT
 1470
 GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT GAA
 1500
 AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA
 1530
 ATG GAT TAC GTT GCT AGT CAA GTT TCA AAT
 1560
 GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT
 1590
 GTG GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT
 1620
 AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA

CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG

8. 配列番号 8

- (1) 配列の長さ : 548
- (2) 配列の型 : アミノ酸
- (3) トポロジー : 直鎖状
- (4) 配列の種類 : ペプチド
- (5) 配列の起源 : ルシオラ・ラテラリス
- (6) 配 列 :

10
 Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile
 20
 Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile
 30
 Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg
 40
 Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly
 50
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly
 60
 Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu
 70
 Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys
 80
 Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 90
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe
 100
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile
 110
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile
 120
 Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu
 130
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser
 140
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr
 150
 Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr
 160
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
 170
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile
 180
 Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly
 190
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg
 200
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser
 210
 Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 220
 Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg
 230

33

Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly
 240
 Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
 250
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly
 260
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys
 270
 Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe
 280
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln
 290
 Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val
 300
 Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser
 310
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn
 320
 Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
 330
 Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala
 340
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln
 350
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala
 360
 Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys
 370
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu
 380
 Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr
 390
 Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly
 400
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
 410
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr
 420
 Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu
 430
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu
 440
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu
 450
 Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln

(6) 配列 : AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC GAC ATT TTC ACG AGT

10. 配列番号10

(1) 配列の長さ : 36

(2) 配列の型 : 核酸

34

Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu
 460
 Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly
 470
 Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
 480
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Gln
 490
 Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val
 500
 Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn
 510
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe
 520
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 530
 Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile

Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

9. 配列番号9

(1) 配列の長さ : 36

(2) 配列の型 : 核酸

(3) 鎖の数 : 一本鎖

(4) トポロジー : 直鎖状

(5) 配列の種類 : 他の核酸 合成DNAプライマー

* (3) 鎖の数 : 一本鎖

(4) トポロジー : 直鎖状

* 50 (5) 配列の種類 : 他の核酸 合成DNAプライマー

(6) 配列 : AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC CAA ATT TTC ACG AGT

11. 配列番号11

* (3) 鎖の数 : 一本鎖

(1) 配列の長さ : 36

(4) トポロジー : 直鎖状

(2) 配列の型 : 核酸

* (5) 配列の種類 : 他の核酸 合成DNAプライマー

(6) 配列 : AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC GAT ATT TTC ACG AGT

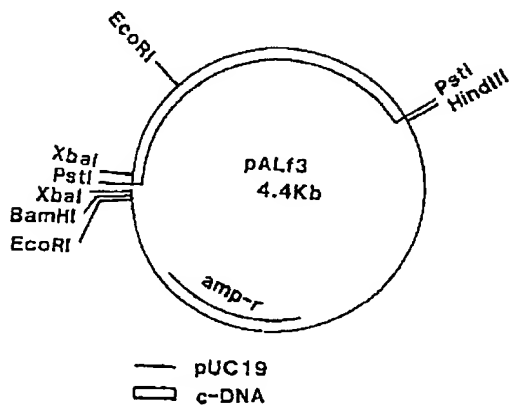
【図面の簡単な説明】

※ 【図2】 組み換え体プラスミド pGLf DNA の制限酵素による切断地図。

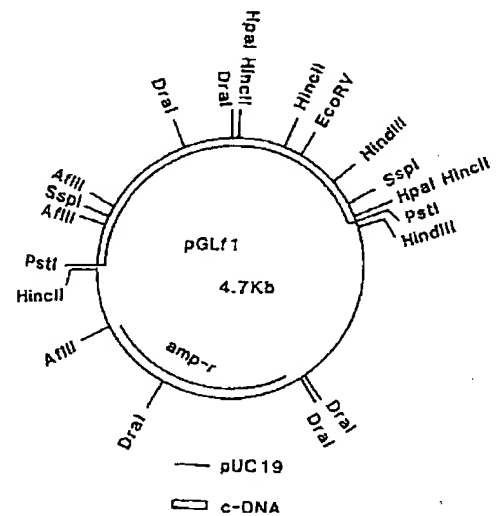
【図1】 組み換え体プラスミド pALf DNA の制限酵素による切断地図。

※

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)